

20) 冷水病菌から抽出した粗リポ多糖 (LPS) の 浸漬ワクチンとしての有効性

金辻宏明・二宮浩司・山本充孝・遠藤 誠

【目的】 本研究では冷水病被害の対策を講じる一環として、一般に免疫原性が高いと考えられているリポ多糖(LPS)を培養冷水病菌*Flavobacterium psychrophilum*から抽出し、LPSを単一、*Vibrio*病菌と結合させてワクチンとしての有効性を検討した。

【方法】 供試魚には11月に琵琶湖で採捕され、冷水病経験のない平均体重2.8gの湖産アユを用いた。ワクチンには冷水病菌から抽出したLPSを単一、*Vibrio*病菌と結合したものの、FKCを単一または*Vibrio*病菌と混合したものの4種類を用いた。なお、FKCと*Vibrio*病菌混合区はワクチン競合の有無を調べるために設定した。用いた供試菌株(SG990302株)、培養方法およびFKCの作製方法は前報¹⁾と同様とした。粗LPSは培養菌体からフェノール水を用いたWestpaulの方法²⁾で抽出し、凍結乾燥後、4℃で保存した。*Vibrio*病菌にはピンバックビブリオ【共立製薬】を市販状態で 1×10^9 cells/mlの濃度として用いた。LPSと*Vibrio*病菌との結合は、LPS 20mgと 2×10^{11} cells相当の*Vibrio*病菌をタンニン酸法で反応させて行い、結合状態は蛍光抗体法で確認した。ワクチンの投与は前報と同様に³⁾表1に示す濃度で浸漬区で10min、注射区で供試魚の腹腔内に50 μ l接種して行った。免疫期間中は供試魚を0.5 t 水槽に収容して地下水を通水し、市販飼料を与えて飼育(2%魚体重/day)した。攻撃は免疫3および6week後に冷水病発生飼育水槽水導入法で行った。なお対照区には無処理魚を用いた。またワクチンの有効性は次の式により算出して評価した。有効率(%) = $\{1 - (\text{試験区死亡率} / \text{対照区死亡率})\} \times 100$

【結果】 免疫3week後の攻撃試験の結果をおよび有効率をそれぞれ図1および表1に、6週後の結果をそれぞれ図2および表2に示した。3week後ではFKC注射区で最も高く、最終生残率および有効率はそれぞれ37.5%および28.6%であった。次にFKC-*Vibrio*病菌混合注射区、LPS結合浸漬区の順で無処理区より効果が認められた。免疫6week後ではFKC注射区で最も高く、最終生残率および有効率はそれぞれ47.6%および45%で免疫3week後よりも有効性は向上した。次にFKC-*Vibrio*病菌混合注射区、LPS結合浸漬区、FKC浸漬区の順で無処理区より効果が認められ、3week後の結果より有効率は上昇した。しかし、FKC注射ワクチンを超える効果は認められなかった。なお、ビブリオ病菌との混合で顕著なワクチン競合は認められなかった。以上の結果から本試験で用いたLPSを単一および*Vibrio*病菌と結合して接種しても、注射、浸漬の両方で有効性の向上は期待できないと推察された。

表1 本試験で用いたワクチンの種類、接種方法および接種量

ワクチン	接種法	
	浸漬免疫	注射免疫
LPS-結合ワクチン	1×10^8 cfu/ml	5×10^7 cfu/fish
FKC-混合ワクチン	1×10^8 cfu/ml	5×10^7 cfu/fish
LPS単一接種	10 μ g/l	20 μ g/fish
FKC単一接種	1×10^8 cfu/ml	5×10^7 cfu/fish

※FKC-混合ワクチンの菌濃度は冷水病菌、ビブリオ病菌それぞれの量(同量)を示す。

- 文献 1) 金辻宏明：冷水病菌体を用いた免疫原性強化ワクチン作製方法の検討，平成14年度滋賀水試事報，in press (2003).
2) O. Westphal and K. Jann: Bacterial Lipopolysaccharides. Extraction with Phenol-Water and Further Applications of the Procedure. by R. L. Whistler, J. N. BeMiller and M. L. Wolfrom, "Methods in Carbohydrate Chemistry" Vol. V, Academic Press, New York, 83-91 (1965).
3) 金辻宏明：ハプテン化および免疫原性強化した冷水病菌体ワクチンの有効性，平成14年度滋賀水試事報，in press (2003).

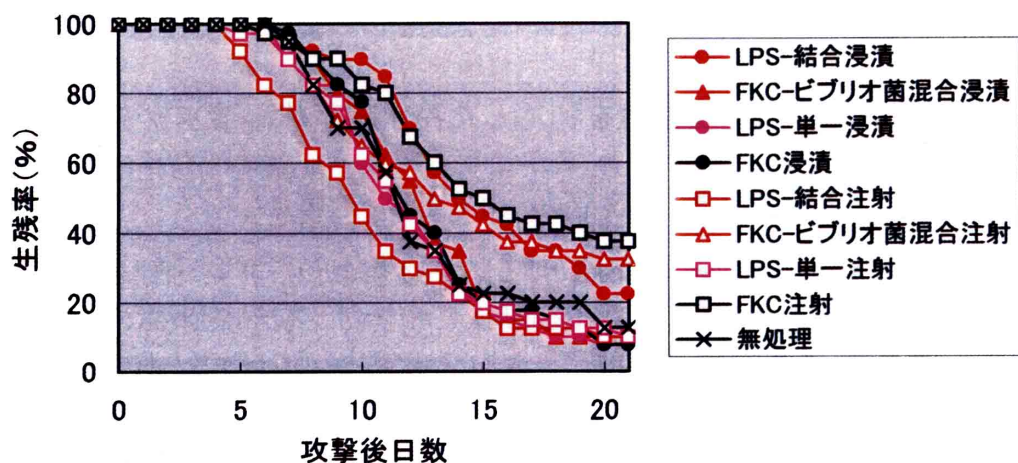


図1. 冷水病菌粗リポ多糖(LPS)を浸漬または注射して3週間後のアユの攻撃による生残率の推移.

表1 冷水病粗LPS接種3週間後の浸漬および注射ワクチンとしての有効率

	ワクチンの有効率(%)			
	LPS-Vibrio結合	FKC-Vibrio混合	LPS単一	FKC単一
浸漬免疫	11.4	-2.9	-5.7	-5.7
注射免疫	-2.9	22.9	-2.9	28.6

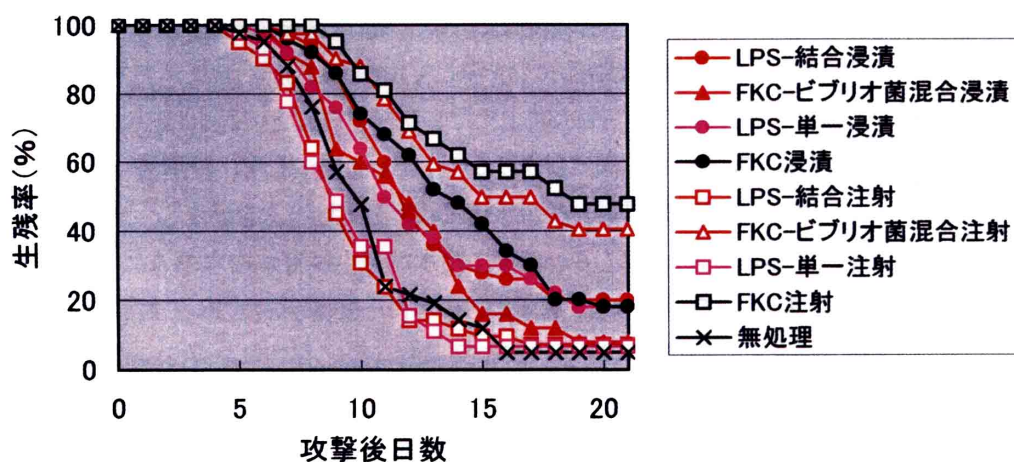


図2. 冷水病菌粗リポ多糖(LPS)を浸漬または注射して6週間後のアユの攻撃による生残率の推移.

表2 冷水病粗LPS接種6週間後の浸漬および注射ワクチンとしての有効率

	ワクチンの有効率(%)			
	LPS-Vibrio結合	FKC-Vibrio混合	LPS単一	FKC単一
浸漬免疫	16.0	3.4	13.9	13.9
注射免疫	2.5	37.5	2.0	45.0